

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月19日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592122

研究課題名（和文） アドレノメデュリンの抗菌作用による口腔バイオフィルムの形成抑制効果に関する研究

研究課題名（英文） Study of the effects of adrenomedullin upon oral biofilm formation

研究代表者

尾崎 和美 (OZAKI KAZUMI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：90214121

研究成果の概要（和文）：本研究において、アドレノメデュリン（ADM）標品あるいはADM発現形質転換株（宿主：*E. coli*, *S. gordonii*）の口腔細菌に対する抗菌活性あるいはバイオフィルム形成抑制効果等を解析したところ、ADM（13-52）をはじめ数種の関連ペプチドが抗菌活性を示した。またADM（13-52）ペプチドを分泌する形質転換株（*S. gordonii*）には口腔細菌（グラム陽性菌）が産生するバイオフィルムの形成を抑制する能力を有することが示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a recombinant *S. gordonii* strain expressing and secreting adrenomedullin or its related peptide, which is bioactive and antibacterial peptide, and the ability of the strain to inhibit the cell growth of periodontopathic bacteria and biofilm formation by oral streptococci and lactobacilli was assayed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：バイオフィルム，アドレノメデュリン，抗菌ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

アドレノメデュリン（Adrenomedullin, 以下ADMと略す）は1993年にヒト褐色細胞腫より発見されたペプチドであり、以後、降圧作用や血管新生作用あるいは関節リウマチの発症・進行の抑制作用（Gonzales-Rey E. *et al.*, *Am J Pathol*, 2007）など、様々な免疫調節機構に関与していることが明らかにされつつある一方、特定の腸内細菌に対する抗菌活性

を有することも報告されている（Dale B.A. *et al.*, *Curr Issues Mol Biol*, 2005）。

我々は、口腔バイオフィルムが原因となり発症する歯周炎の発症機構を解明すべく、ヒト歯肉線維芽細胞を用いた *in vitro* 系での各種解析を行ってきたが、その過程で、TNF- $\alpha$ で誘導されたヒト歯肉線維芽細胞によるケモカインの産生、すなわちTh1細胞の遊走に関与しているとされるCXCL10の産生が、

ADM によって抑制されることを見出した (Hosokawa I. *et al.*, Clin Exp Immunol, 2008)。

ADM が持つ生理活性、特に我々が見出した上記の知見である“ADM によるヒト歯肉線維芽細胞のケモカイン産生抑制”は、歯周病の骨吸収に関与している Th1 細胞の歯周病病変局所への遊走抑制、ひいては歯周病における骨吸収抑制という免疫調節剤としての ADM の可能性を示唆するものであるが、歯科領域への応用を鑑みた場合、上記の生理活性だけでなく、本ペプチドが有する抗菌活性を期待した口腔バイオフィーム形成抑制効果による根面齲蝕や歯周病の発症予防への応用も可能ではないかと考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

根面齲蝕や歯周病の発症予防という観点から、口腔バイオフィームの形成抑制効果など、口腔細菌に対するアドレノメデュリンの抗菌効果を検証することを目的とし、以下の観点から多面的解析を行った。

(1) ADM ならびに関連ペプチド標品の口腔細菌に対する抗菌効果

(2) *Escherichia coli* および歯面への初期付着菌群の一つとして知られ、かつ齲蝕原性が低い *Streptococcus gordonii* をベクター宿主とした ADM 発現形質転換株の作製および分泌 ADM による口腔細菌の増殖抑制効果の検証

(3) ADM 発現形質転換株が分泌する ADM による口腔細菌 (グラム陽性菌) のバイオフィーム形成抑制効果の検証

## 3. 研究の方法

### (1) ADM の抗菌活性の測定

ADM の抗菌活性を、細胞培養用 U 底 96 well プレートを用いた微量液体希釈法を用いて行った。ADM ならびに関連ペプチドとして、mature ADM (1-52), ADM (1-12, 13-52, 16-52) および ADM (22-52, ADM antagonist) を用いた。一方、被検菌株として、グラム陽性菌の *Streptococcus mutans* UA159 (以下, Sm), *Streptococcus sobrinus* B13 (以下, Ss), *Lactobacillus casei* ATCC4646 (以下, Lc), およびグラム陰性菌である *Porphyromonas*

*gingivalis* ATCC33277 (以下, Pg 33277), *Porphyromonas gingivalis* W 83 (以下, PgW83) を用いた。ミューラーヒントンブロス (グラム陽性菌用) あるいはヘミンおよびビタミン K3 (メナジオン) を添加したブレインハートインフュージョンブロス (グラム陰性菌用) を用いて前培養した細菌懸濁液を、連続希釈した上記の各ペプチドが 100  $\mu$ l 添加されたウェル中に 1x10<sup>4</sup> 個の割合となるよう接種した。そして、24 時間または 48 時間嫌気培養した後、最小発育阻止濃度 (MIC) を判定した。

(2) ADM 発現形質転換株の作製および分泌 ADM による口腔細菌の増殖抑制効果の検証

### ① ADM 発現形質転換株 (*E. coli*) の作製

ADM を構成する 52 個のアミノ酸配列をコードする遺伝子 (dsDNA) および *S. downei* の Signal peptide の配列を元に作製した。得られた形質転換株から分泌する ADM は、免疫沈降法により精製後、immunoblot で確認した。

### ② ADM 発現形質転換株 (*S. gordonii*) の作製

上記①で cloning した linker peptide を含む ADM (1-52 および 13-52) 配列部分を元に、shuttle vector (pBE31) への cloning および *S. gordonii* への導入により作製した。

### ③ 形質転換株から分泌される ADM による口腔細菌の増殖抑制効果の検証

セルカルチャーインサート (24well, 0.4  $\mu$ m  $\phi$  ポアサイズ) の内外に形質転換株と前述の口腔細菌 5 種各々を接種し嫌気条件 (37°C, 12 または 48 時間) 下で共培養した。次に、口腔細菌の培養懸濁液を生理食塩水で希釈し血液寒天培地に播種し嫌気培養した後、生育したコロニー数を測定し、形質転換株の親株を用いた場合のコロニー数との比として算出し増殖抑制効果を判定した。

### (3) ADM 発現形質転換株が分泌する ADM による口腔細菌 (グラム陽性菌) のバイオフィーム形成抑制効果の検証

#### ① 象牙質試料の調製および培養

ウシ歯の歯根部より歯軸方向に平行となる厚さ約 500  $\mu$ m の象牙質試料を、低速切断機を用いて作成後、4×4 mm にトリミングし、研磨紙を用いて厚さ 300  $\mu$ m の厚さまで手研

磨した。次に、この試料を超音波洗浄、水洗、EOG 滅菌後、宿主を *S. gordonii* とした ADM 発現形質転換株を用いた上記 (2) ③ の培養系 (0.25% グルコース添加) に供し、被検細菌にバイオフィルムを形成させた。

#### ②非水溶性ならびに水溶性グルカンの合成量の測定

各培地での培養を終えたグラム陽性菌 3 種の各ウェルより、培地と象牙質試料を別々に処理し、培地からは非水溶性および水溶性グルカンを、また象牙質試料表層に付着した非水溶性グルカンを各々 0.5N NaOH で溶解させた。そして各試料を遠心後、上清をフェノール硫酸法 (Nisizawa et al., 1976) によるグルカン量の測定に供した。すなわち、合成グルカンを 0.5N NaOH 500  $\mu$ l にて溶解後、グルカン溶液 30  $\mu$ l に 10%フェノール水溶液を 30  $\mu$ l 添加、その後、濃硫酸を 100  $\mu$ l 添加し、波長 490 nm の吸光度を測定した。得られた吸光度は濃度を規定したグルコース溶液を基に作製した標準曲線を用いてグルカンの濃度に換算した。

③象牙質付着不溶性グルカンおよびグルカン内 (バイオフィルム内) 細菌における菌体内外多糖に関する超微形態学的解析  
上記 (3) ① の培養により形成されたバイオフィルムをアルデヒドおよびオスミウムで二重固定した後、通法に従い Epoxy 樹脂に包埋し超薄切片を作製した。この切片に対し過ヨウ素酸-チオカルボヒドラジド-蛋白銀染色 (菌体内外多糖特異的電子染色) を施行し透過型電子顕微鏡にて観察することで、口腔細菌の菌体内多糖の産生状況を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 口腔細菌に対する ADM の抗菌活性

口腔細菌に対する ADM の抗菌活性を図 1 に示す。ADM (1-52) および ADM (1-12) は、いずれの菌株に対しても抗菌活性を示さなかったが、ADM (13-52) , ADM (16-52) および ADM (22-52) は様々な濃度で抗菌活性を示した。これら 3 種の関連ペプチドは、総じてグラム陽性菌である Sm, Ss および Lc よりもグ

ラム陰性菌である 2 種の Pg に対して強い抗菌活性を示した。また、ペプチド間で比較すると、概ね ADM (13-52) >ADM (16-52) >ADM (22-52) の順で強い抗菌活性を認めた。

被検菌株	MIC ( $\mu$ g/ml)				
	1-52 <sup>†</sup>	1-12	13-52	16-52	22-52
Sm	-	-	3.13	6.25	6.25
Ss	-	-	1.56	3.13	6.25
Lc	-	-	3.13	3.13	12.50
Pg 33277	-	-	0.20	0.39	0.39
Pg W83	-	-	0.20	0.20	0.39

図 1. 口腔細菌に対する各種ADMの抗菌活性

<sup>†</sup>: ADM および関連ペプチド  
-: 12.50  $\mu$ g/ml で抗菌活性を認めず。

### (2) 形質転換株から分泌される ADM による口腔細菌の増殖抑制効果

結果を図 2 に示す。宿主の如何に関わらず、ADM (1-52) 分泌型よりも ADM (13-52) 分泌型形質転換株と共培養した場合に、被検対象の 5 菌種の増殖がいずれも抑制され、特にグラム陰性菌である Pg33277 および Pg W83 に対して顕著であった。これら 2 菌種を用いた培養の際に、過剰の抗 ADM 抗体を培地に添加し同様に検索したところ、明らかに増殖抑制効果が減じられたことから、本実験での増殖抑制効果が、形質転換株から分泌される ADM によるものであることが確認された。

菌株	宿主	<i>E. coli</i>		<i>S. gordonii</i>	
		1-52 <sup>†</sup>	13-52	1-52	13-52
Sm		1.25 <sup>**</sup>	1.01	1.19	0.87
Ss		1.11	0.86	0.95	0.79
Lc		1.03	0.92	1.02	0.84
Pg 33277		1.20	0.77	0.99	0.56
Pg W83		1.16	0.69	1.11	0.68

図 2. ADM発現形質転換株の分泌ADMによる口腔細菌の増殖抑制効果

<sup>†</sup>: ADM および関連ペプチド  
<sup>\*\*</sup>: 親株使用時の口腔細菌の生育コロニー数に対する ADM発現形質転換株使用時の生育コロニー数の割合 (比)

### (3) ADM 発現形質転換株が分泌する ADM による口腔細菌 (グラム陽性菌) のバイオフィルム形成抑制効果

*S. gordonii* を宿主とした ADM 発現形質転換株と共培養したグラム陽性菌 3 菌種の培養上清中の不溶性グルカン、水溶性グルカンおよび培養液中に浸漬した象牙質板に付着した不溶性グルカンの合成量を図 3～5 に示す。被検菌種の如何に関わらず、また解析対象としたグルカンの種類に関わらず、ADM (13-52) 分泌型形質転換株と共培養した場合、ADM (1-52) 分泌型の場合に比べ、グルカン合成量は相対的に低値を示し、ADM (13-52) 分泌型形質転換株は口腔バイオフィルムの形成を抑制する能力を有することが示された。

菌株	ADM (1-52) <sup>††</sup>	ADM (13-52)
Sm	543.2 ± 42.5	431.9 ± 51.0
Ss	493.2 ± 51.6	408.7 ± 45.3
Lc	289.0 ± 38.1	198.6 ± 27.4

図 3. グラム陽性菌のグルカン合成量 (培養上清中の不溶性グルカン)

菌株	ADM (1-52) <sup>††</sup>	ADM (13-52)
Sm	151.3 ± 36.1	120.9 ± 31.0
Ss	140.2 ± 24.6	112.8 ± 28.7
Lc	105.7 ± 11.8	83.6 ± 13.3

図 4. グラム陽性菌のグルカン合成量 (培養上清中の水溶性グルカン)

菌株	ADM (1-52) <sup>††</sup>	ADM (13-52)
Sm	78.7 ± 20.8	46.7 ± 19.2
Ss	69.3 ± 28.4	42.2 ± 21.1
Lc	53.1 ± 23.7	34.0 ± 16.3

図 5. グラム陽性菌のグルカン合成量 (象牙質付着不溶性グルカン)

†† : 口腔細菌と共培養した ADM 発現形質転換株 (宿主: *S. gordonii*) の分泌型  
※ : p < 0.05

ルカン内細菌に対して行った菌体内外多糖

特異的電子染色により、ADM (13-52) 分泌型形質転換株と共培養した場合の方が、ADM (1-52) 分泌型の場合に比べ、菌体外多糖の網目様構造が疎になり、さらに被検対象としたグラム陽性菌 3 種のいずれにおいても菌体内多糖顆粒の減少が観察された (図 6 A~F)。

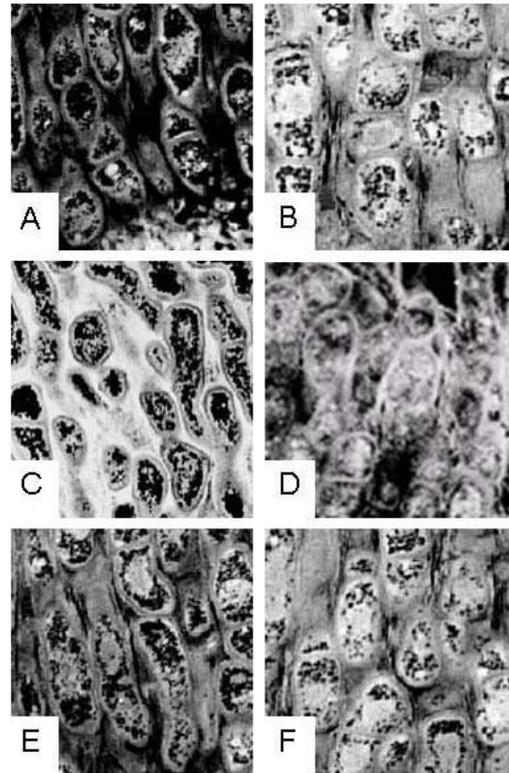


図 6. 象牙質付着不溶性グルカンおよびグルカン内口腔細菌における菌体内外多糖の微細構造

A : ADM (1-52) 共培養 Sm, B : ADM (13-52) 共培養 Sm  
C : ADM (1-52) 共培養 Ss, D : ADM (13-52) 共培養 Ss  
E : ADM (1-52) 共培養 Lc, F : ADM (13-52) 共培養 Lc  
観察倍率 : いずれも × 8,000

以上の結果から、*S. gordonii* を宿主とした ADM 発現形質転換株のうち、標品において相対的に強い抗菌活性を示した関連ペプチド (ADM (13-52)) を分泌する形質転換株との共培養により、グラム陽性菌のバイオフィルム形成が抑制されることが確認され、その機序として細菌の増殖抑制効果ならびに菌体内多糖合成の抑制が関与していることが示唆された。また、う蝕ならびに歯周病の予防という観点から、口腔バイオフィルムの生物学的コントロール手段としての本形質転換

株の有用性が示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- ① Hosokawa Y., Hosokawa I., Shindo S., Ozaki K., Nakae H., Matsuo T. : Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis increases CC chemokine ligand 20 production in interleukin 1 $\beta$ -stimulated human gingival fibroblasts. Hum Immunol, 査読有, 73, 2012, pp. 470-473, DOI : 10.1016/j.humimm.2012.02.021.
- ② Hosokawa Y., Hosokawa I., Ozaki K., Nakae H., Matsuo T. : Interleukin (IL)-17A synergistically enhances CC chemokine ligand 20 production in IL-1 $\beta$ -stimulated human gingival fibroblasts. Hum Immunol, 査読有, 73, 2012, pp. 26-30, DOI : 10.1016/j.humimm.2011.10.004
- ③ Hosokawa Y., Hosokawa I., Shindo S., Ozaki K., Nakanishi T., Nakae H., Matsuo T. : Black tea polyphenol inhibits CXCL10 production in oncostatin M-stimulated human gingival fibroblasts. Int Immunopharmacol, 査読有, 11, 2011, pp. 670-674, DOI : 10.1016/j.intimp.2011.01.009
- ④ Hosokawa Y., Hosokawa I., Ozaki K., Nakae H., Matsuo T. : Oncostatin M synergistically induces CXCL10 and ICAM-1 expression in IL-1 $\beta$ -stimulated human gingival fibroblasts. J Cell Biochem, 査読有, 111, 2010, pp. 40-48, DOI : 10.1002/jcb.22648.
- ⑤ Hosokawa I., Hosokawa Y., Ozaki K., Yumoto H., Nakae H., Matsuo T. : Proinflammatory effects of muramyl dipeptide on human gingival fibroblasts. J Periodontal Res, 査読有, 45, 2010, pp. 193-199, DOI : 10.1111/j.1600-0765.2009.01217.x.
- ⑥ Hosokawa Y., Hosokawa I., Ozaki K.,

Nakanishi T., Nakae H., Matsuo T. : Tea polyphenols inhibit IL-6 production in tumor necrosis factor superfamily 14-stimulated human gingival fibroblasts. Mol Nutr Food Res, 査読有, 54 (Suppl 2), 2010, pp. S151-S158, DOI : 10.1002/mnfr.200900549.

- ⑦ Hosokawa Y., Hosokawa I., Ozaki K., Nakae H., Matsuo T. : TNFSF14 coordinately enhances CXCL10 and CXCL11 productions from IFN- $\gamma$ -stimulated human gingival fibroblasts. Mol Immunol, 査読有, 47, 2010, pp. 666-670, DOI : 10.1016/j.molimm.2009.10.018.
- ⑧ Hosokawa Y., Hosokawa I., Ozaki K., Nakanishi T., Nakae H., Matsuo T. : Catechins inhibit CXCL10 production from oncostatin M-stimulated human gingival fibroblasts. J Nutr Biochem, 査読有, 21, 2010, pp. 659-664, DOI : 10.1016/j.jnutbio.2009.04.005.

[学会発表] (計14件)

- ① 細川育子: The effect of adrenomedullin on human Th17 cells differentiation. 第60回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会, 2012.12.14, 新潟コンベンションセンター (新潟市)
- ② 細川義隆: IL-17A は TNF- $\alpha$  が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CCL20 産生を増強する, 第137回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2012.11.23, 広島国際会議場 (広島市)
- ③ 細川育子: Adrenomedullin が樹状細胞の Th17 関連サイトカイン産生に及ぼす影響, 第137回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2012.11.22, 広島国際会議場 (広島市)
- ④ 石川真琴: 歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* 感染が肝臓糖代謝に及ぼす影響, 第137回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2012.11.22, 広島国際会議場 (広島市)
- ⑤ 細川義隆: TNF- $\alpha$  と IL-4 刺激が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CCL11 産生に及ぼす緑茶カテキンの影響, 第136回日本歯科保存学

会春季学術大会, 2012.6.29, 沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)

- ⑥細川義隆:IL-22 は IL-1  $\beta$  が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CCL20 産生を増強する, 第 55 回春季日本歯周病学会学術大会, 2012.5.19, 札幌コンベンションセンター(札幌市)
- ⑦細川義隆:TWEAK がヒト歯肉線維芽細胞の IL-1  $\beta$  誘導 CCL20 産生に与える影響, 第 135 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2011.10.21, 大阪国際交流センター(大阪市)
- ⑧細川義隆:Theaflavin が TNFSF14 刺激ヒト歯肉線維芽細胞の IL-6 産生に与える影響, 第 134 回日本歯科保存学会春季学術大会, 2011.6.10, 千葉県, 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(浦安市)
- ⑨尾崎和美:う蝕関連細菌の家族内伝播と生活習慣による影響に関する検索-兄弟姉妹間の差異について-, 第 134 回日本歯科保存学会春季学術大会, 2011.6.9, 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(浦安市)
- ⑩細川義隆:TLR3 ligand がヒト歯肉線維芽細胞の IL-1  $\beta$  誘導 CCL20 産生に与える影響, 第 54 回春季日本歯周病学会学術大会, 2011.5.27, 福岡国際会議場(福岡市)
- ⑪進藤智:Oncostatin M が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CXCL10 産生に及ぼす紅茶ポリフェノールの影響, 第 54 回春季日本歯周病学会学術大会, 2011.5.27, 福岡国際会議場(福岡市)
- ⑫細川義隆:Catechin が TNFSF14 刺激ヒト歯肉線維芽細胞の IL-6 産生に与える影響, 第 133 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2010.10.28, 長良川国際会議場(岐阜市)
- ⑬橋本玲奈:IL-1  $\beta$  が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CXCL10 産生に及ぼす緑茶カテキンの影響, 第 53 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2010.9.19, サンポートホール高松(高松市)
- ⑭細川義隆:IL-17A は IL-1  $\beta$  が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CCL20 産生を増強する, 第 53 回春季日本歯周病学会学術大会, 2010.5.14, いわて県民情報交流センター(盛

岡市)

〔図書〕(計 1 件)

- ①片山直, 小松正志, 松尾敬志 編集, クインテッセンス株式会社, 新・歯科衛生士教育マニュアル 保存修復, 2012, 161 (pp.16p29)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾崎 和美 (OZAKI KAZUMI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号: 9 0 2 1 4 1 2 1

### (2) 研究分担者

中江 英明 (NAKAE HIDEAKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 3 0 2 2 7 7 3 0

湯本 浩通 (YUMOTO HIROMICHI)

徳島大学・大学病院・講師

研究者番号: 6 0 2 8 4 3 0 3

細川 義隆 (HOSOKAWA YOSHITAKA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号: 9 0 3 4 6 6 0 1

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号: